

طراحی ژن stxA موتانت (R170L -A231D -G234E) شیگلا دیسانتری و بهینه سازی بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب آن

دکتر غلامرضا اولاد*^۱، محمود تولایی^۲، زهیر محمد حسن^۳، فیروز ابراهیمی^۱، جعفر سلیمیان^۱، شهرام

نظریان^۱، علی اصغر رحیمی^۱

^۱ مرکز تحقیقات زیست شناسی - دانشگاه امام حسین (ع)، تهران، ایران، ^۲ مرکز تحقیقات ژنتیک - دانشگاه علوم پزشکی بقیه اله، تهران، ایران، گروه

ایمنولوژی - دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۵ اصلاح نهایی: ۹۰/۳/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۰/۴/۱۴

چکیده:

زمینه و هدف: شیگلا دیسانتری یکی از مهمترین باکتری های بیماریزای روده ای انسان است. شیگاتوکسین (سم این باکتری) با ورود به سلول های اپیتلیال باعث مهار سنتز پروتئین و مرگ سلولی می شود. علیرغم مطالعات فراوان جهت تولید واکسن علیه آن، هنوز ضرورت تداوم مطالعه در حصول به پروتئین نو ترکیب شیگاتوکسین نوع A (stxA) وجود دارد. این مطالعه با هدف بررسی و تعیین جایگاه های مناسب جهش و طراحی ژن سینتتیک زیر واحد stxA و سپس بیان و بهینه سازی آن و در نهایت بررسی روش تخلیص آن جهت مطالعات بعدی ایمنی زایی انجام شد.

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی پس از طراحی و تهیه ژن صناعی pET28a/stxA موتانت (R170L -A231D -G234E)، واکنش PCR جهت کنترل صحت حضور این ژن انجام گردید. پس از انتقال این وکتور به سلول میزبان BI21 DE3، بیان، بهینه سازی و نهایتاً تخلیص پروتئین حاصل بررسی گردید. یافته ها: نتیجه مطالعات اولیه منجر به طراحی ژن stxA موتانت گردید. نتایج واکنش PCR با استفاده از پلاسمید سنتتیک نشان از صحت ژن مورد مطالعه داشت. پس از بیان این ژن در سلول میزبان BI21 DE3، بهینه سازی آن نیز بررسی گردید. در نتیجه تولید مقادیر زیادی از این پروتئین به شکل اجسام توده ای نشان داده شد. تخلیص انکلوژن بادی و سپس محلول سازی پروتئین های مربوطه با استفاده از روش های تلفیقی صورت گرفت.

نتیجه گیری: با توجه به مکانیسم اثر شیگاتوکسین و طراحی جهش های انتخابی با آرایش جدید در این ژن، پیش بینی می شود که این پروتئین بیانی، دارای اثر سمیت کمتری نسبت به سایر موتانت های قبلی داشته باشد، در نتیجه می تواند به عنوان کاندید واکسن برتر مطرح گردد.

واژه های کلیدی: بهینه سازی بیان، stxA موتانت، واکسن نو ترکیب، شیگاتوکسین، شیگلا دیسانتری

مقدمه:

است که با اتصال به رسپتورهای سطحی سلول های هدف (Globotriaosglceramide) Gb3: α Gal (1-4) β Gal (1-4) β Glc ceramid=Gb3 باعث اپوپتوزیس و مرگ سلول خواهد شد (۴-۶). این توکسین را باکتری شیگلا دیسانتری نوع ۱ تولید می نماید، همچنین توکسینی مشابه با آن با نام Stx1 و Stx2 توسط *E.coli* O₁₅₇ نیز تولید می گردد که مشابهت آنها ۹۸ درصد است (۷-۹). حساسیت سلول های

باکتری شیگلا دیسانتری یکی از مهمترین باکتری های بیماریزای روده ای انسان می باشد (۱-۳). علت اصلی همه گیری اسهال ناشی از شیگلوزیس در یک قرن اخیر این باکتری بوده است. مهمترین فاکتور بیماریزا در این باکتری اگزوتوکسین (stx = Shigatoxin) (با دو زیر واحد A و B) با سمیت فوق العاده بالا و کشنده ($LD_{50} = 8.5 \mu g/Kg$)، یک مولکول هگزامری با وزن مولکولی در حدود ۷۰ kD

اندوتلیال کلیه انسان به Stx در مقایسه با Stx1 تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر است (۱۰). به همین دلیل عامل اصلی ایجاد کننده بیماری خون ادراری (Hemolytic Uremic Syndrom) HUS معرفی گردیده است (۱۱).

سمیت و قدرت ایمنی زایی شیگاتوکسین (Stx) بسیار بالا است به شکلی که حدود ۲۸ نانوگرم آن باعث مرگ یک موش می گردد و همچنین بدلیل قدرت آنتی ژنی بالا، دارای پتانسیل ایجاد پاسخ ایمنی و تولید آنتی بادی علیه توکسین در بدن میزبان می باشد (۴، ۵، ۱۲). زیر واحد StxB با ۶۹ اسید آمینه و وزن مولکولی حدود ۷/۷ کیلو دالتون، به صورت پنتامر به زیر واحد StxA با ۲۹۴ اسید آمینه با وزن مولکولی در حدود ۳۲ kD متصل است. شیگاتوکسین ابتدا بواسطه زیر واحد B به رسپتور سطحی Gb3 مستقر در غشاء سلول اپیتلیال متصل شده و تشکیل یک کمپلکس پوشیده از مولکول کلاترین می دهد و به صورت یک وزیکول طی فرآیند اندوسیتوز، انتقال داخل سلولی انجام می گردد (۱۵-۱۳). سپس یک آنزیم سرین پروتئاز به نام Furin در گلژی باعث برش پیوند پپتیدی میان دو بخش A1 (28 kD) و A2 (4 kD) می گردد. متعاقب آن این مجموعه بواسطه رسپتورهای KDEL موجود در غشاء شبکه آندوپلاسمی به شبکه آندوپلاسمی وارد و در نتیجه احیای پیوند دی سولفیدی باقیمانده میان A1 و A2، آنها را کاملاً از هم جدا می نماید (۱۶، ۱۷). نهایتاً پروتئین خطی A1 با واسطه پروتئین Sec61 غشاء شبکه آندوپلاسمی به سیتوزول منتقل می گردد و StxB نیز به غشاء سلول بر می گردد. A1 ضمن فعالیت آنزیمی N-گلیکوزیدازی با حذف یک باز آدینین از 28S rRNA در زیر واحد 60S ریوزوم و در نتیجه مهار عملکرد فاکتورهای EF-1 و EF-2 و نهایتاً جلوگیری از طویل شدن زنجیره پپتیدی، موجبات مهار سنتز پروتئین و مرگ سلول میزبان را فراهم آورد (۱۶، ۲۱-۱۸).

تاکنون مطالعات فراوانی بر روی انواع واکسن این عامل و اخیراً واکسن نو ترکیب موتانت انجام گردیده است. محققین همواره به دنبال این بوده اند که

دریابند برای طراحی این واکسن نو ترکیب کدام یک از دو زیر واحد StxB یا StxA بصورت مجزا و یا همزمان مناسب تر می تواند باشند. مهمترین اصل در طراحی واکسن، حصول پروتئینی نو ترکیب با حداقل اثر سمیت و بهترین اثر ایمنی زایی برای میزبان و در عین حال نزدیک ترین ساختار مولکولی به پروتئین Native است. چرا که توکسین طبیعی علاوه بر دارا بودن سمیت، به صورت ذاتی خود دارای بالاترین درجه ایمنی زایی ذاتی برای میزبان نیز می باشد (۲۲، ۲۳). با توجه به مکانیسم و مسیر اثر توکسین بر سلول های هدف، جهت طراحی یک پروتئین نو ترکیب علیه شیگاتوکسین به عنوان کاندید واکسن تاکنون سه مسیر معرفی و مورد استفاده واقع شده است که عبارتند از:

مسیر اول مبتنی بر ایجاد اختلال در روند اتصال سم به رسپتور است. بر اساس این روش، طراحی واکسن نو ترکیب، علیه زیر واحد اتصال دهنده شیگاتوکسین (StxB) صورت می گیرد و استفاده از آن به عنوان ایمونژن در میزبان، منجر به تولید آنتی بادی هایی می گردد که در صورت حضور توکسین در بدن، آن را خنثی نموده و در نتیجه مانع اتصال توکسین به سلول هدف و در نهایت منجر به مهار و حذف توکسین می گردد. بدیهی است که این ایمونژن فاقد هر گونه اثر سمیت بر میزبان می باشد. لیکن هیچگونه مصونیتی بر علیه زیر واحد کاتالیتیک توکسین (StxA) ایجاد نمی نماید. تاکنون مطالعات متعددی در استفاده از این زیر واحد (StxB) بعنوان کاندید واکسن نو ترکیب و حتی به عنوان واکسن نوع ژنی علیه شیگاتوکسین گزارش گردیده است (۲۸-۲۴).

مسیر دوم مبتنی بر ایجاد اختلال در روند انتقال داخل سلولی توکسین است. در این روش از طراحی واکسن بر اساس StxA موتانت استفاده می شود، که اولاً این زیر واحد نو ترکیب، به تنهایی و در غیاب StxB، توانایی اتصال به رسپتور سلول هدف را ندارد و ثانیاً به فرض محال ورود آن به درون سلول، به دلیل عدم اتصال آن به غشاء اندوزومیک، به ناحیه ای که این زیر واحد را به

زایی و کاهش سمیت این ایمنوژن ها را مورد بررسی قرار دهند. در این مطالعه آرژنین (R) ۱۷۰ با لوسین (L) و در نوبت دیگر با گلايسين (G) جایگزین گردید. نتایج حاصل از تیتراژ آنتی بادی در تست الایزا و تست خنثی سازی سم بوسیله آنتی بادی های حاصل از این دو گروه و نتایج چالش حیوان ایمن، نشان داد که یکی از بهترین آرایش ها، جهش در لوکوس R170L می باشد (۳۰). هدف از این مطالعه، ابتدا بررسی و معرفی ترادفی از ژن زیر واحد stxA بوده است که واجد لوکوس های مناسب جهش با آرایش جدید باشد. سپس بیان و بهینه سازی ژن صنعتی آن، تولید پروتئین نو ترکیب، تخلیص این پروتئین جهت ادامه مطالعه اثر ایمنی زایی آن به عنوان کاندید واکسن بوده است.

روش بررسی:

در این مطالعه توصیفی-آزمایشگاهی در پس از جستجوی اینترنتی پیرامون مطالعات قبلی دیگر محققین در استفاده از جهش های مختلف در این زیر واحد، طراحی ژن صنعتی موتانت stxA واجد جهش نقطه ای در سه لوکوس (R170L, A231D, G234E)، این ژن به صورت اپتیمایز شده در وکتور بیانی pET28a از شرکت چینی (ShineGene) تهیه گردید.

پس از بررسی پلاسمید حامل ژن صنعتی، بوسیله ژل آگاروز، انتقال این وکتور در سلول های میزبان *E. coli* BL21 DE3 از طریق شوک حرارتی صورت پذیرفت. سپس کلنی های غربالگری شده کشت داده شد و پس از آن بیان ژن stxA موتانت در شرایط پایه انجام و محصولات آن بوسیله SDS-PAGE بررسی گردید. با توجه به عدم بیان در بررسی های اولیه، ضمن انجام واکنش PCR (۳۵ سیکل و دمای اتصال ۵۸ درجه سانتیگراد و زمان ۶۰ ثانیه برای هر بخش)، صحت حضور ژن مورد مطالعه، با استفاده از وکتور تخلیص شده از این نمونه ها بررسی گردید.

آغازگر (Primer) پیشرو با ترادف 3'ATGCCATGGCGAAGGAATTTACCTTAG5' و

مولکول A1 فعال با خاصیت آنزیمی تبدیل می نماید، منتقل نخواهد شد. فلذا ایجاد جهش در این نواحی از ژن، باعث کاهش شدید سمیت آن می گردد. تاکنون جهش های مختلفی از آن بررسی گردیده است. لیکن از آن میان G234E, A231D, F226Y جهش های مناسب تر با پایداری بالای پروتئین معرفی شده اند. پروتئین موتانت این زیر واحد در مقایسه با نوع وحشی به صورت انفرادی (A231D) یا (G234E) باعث کاهش تمایل آن به غشاء ER تا ۵۰ درصد می گردد. در حالی که استفاده همزمان از این دو جهش باعث حذف کامل تمایل زیر واحد A1 به غشاء ER و در نتیجه کاهش ۲۲۵ برابری سمیت آن نسبت به توکسین طبیعی می شود (۲۹،۲۸،۷).

مسیر سوم مبتنی بر ایجاد اختلال در عملکرد آنزیمی StxA است. در این نوع واکسن در جایگاه فعال (Active site) زیر واحد A ایجاد جهش می گردد. به شکلی این زیر واحد موتانت اولاً بدون حضور StxB به تنهایی به رسپتور سلول هدف Gb3 متصل نمی شود. ثانیاً بفرض اتصال و طی شدن پروسه انتقال داخل سلولی و حتی بفرض تبدیل به A1 فعال، بدلیل ایجاد تغییرات ساختاری ناشی از این جهش و کاهش شدید تمایل آنزیم به سوبسترای خود (28s rRNA)، قادر به اتصال به آن نخواهد بود. در نتیجه باعث حذف اثر سمیت آن بر سلول میزبان و همچنین پاسخ ایمنی مناسب و بالایی علیه توکسین می گردد (۳۰).

Basu و همکارانش توانستند ضمن ایجاد جهش در جایگاه R170L (جایگزینی آسپاراتات بجای گلوتامات)، اثر سمیت پروتئین نو ترکیب StxA حاصل از آن را تا ۳۰۰ برابر نسبت به توکسین طبیعی کاهش داده و آن را در مقایسه با جهش نوع دوم (A231D- G234E) نیز مورد ارزیابی قرار دهند (۲۹). در مطالعه ای دیگر با استفاده از تکنیک جهش سازی مستقیم نقطه ای (Site-Directed Mutagenesis) SDM در PCR توانستند با ایجاد جهش در همین جایگاه (۱۷۰) و جایگزینی اسید آمینه های مختلف، اثر ایمنی

آغـازگر پـرو با تـرادف
'5'CATTTGAATTCCC'TCAACTGCTAATAGTTC3'
(از شرکت سیناژن) مورد استفاده قرار گرفت.

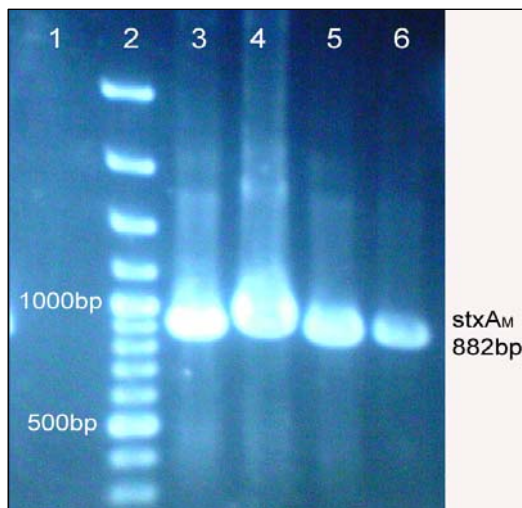
ضمن استفاده از ژل الکتروفورز و سنجش پروتئین به روش برادفورد برای عصاره سلولی و فاز محلول حاصل از آن و مشاهده عدم بیان در نمونه حاصل از ترار یخت مرحله اول، جهت بهینه سازی بیان و تولید پروتئین StxA موتانت در وکتور pET28a برای ۳ کمیت زمان (۵، ۴، ۳، ۲، ۱ ساعت)، دما (۳۷، ۳۰، ۲۵) درجه سانتیگراد و غلظت ماده القاء کننده (۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱، ۱/۵ میلی مولار) تست و بررسی نتایج آن تکرار گردید ولی مکرراً بیان در تمام شرایط فوق منفی گردید. از یکی از این نمونه ها (بصورت راندوم)، پاساژ مجدد بر روی یک پلیت محیط کشت LB جامد دارای آنتی بیوتیک انجام گردید. سپس بیان برای ۴ کلنی تک رشد یافته از پلیت اخیر با شرایط پایه (IPTG 1 mM, 37°C, 6h, 150rpm) اجرا گردید. نظر به مشاهده نتایج خوب بیان، بهینه سازی بیان و تولید پروتئین مورد نظر با تغییر در ۳ کمیت زمان، دما و غلظت ماده القاء کننده (IPTG) تکرار گردید.

بررسی استخراج و تخلیص پروتئین بیانی StxA موتانت نشان داد که این پروتئین در فاز غیر محلول (انکلوژن بادی) سلول قرار دارد. جهت تخلیص انکلوژن بادی از سایر اجزا سلول، از روش زیر استفاده گردید. ابتدا سلول های بیانی بوسیله سانتریفیوژ (بمدت ۳۰ دقیقه در دور ۶۰۰۰) جداسازی شد. رسوب حاصل در بافر حاوی تریس کلراید ۵۰ میلی مولار و EDTA ۵ میلی مولار و (pH=8) حل شده و پس از سونیکیت، سانتریفیوژ گردید. به رسوب حاصل بافر تریس ۵۰ میلی مولار و سدیم داکسی کولات ۱ درصد اضافه گردید و پس از حل نمودن، سونیکیت و سانتریفیوژ گردید. رسوب باقیمانده در محلول سدیم داکسی کولات ۱ درصد به مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق تیمار شده و سپس سونیکیت و سانتریفیوژ گردید. سپس به رسوب حاصل بافر تریس ۵۰ میلی مولار (pH=8.5)

اضافه و بمدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری و سپس سانتریفیوژ گردید. رسوب انکلوژن بادی تخلیص شده برای ادامه مطالعات در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفت (۳۲).

سپس تخلیص پروتئین با استفاده از ستون نیکل-نیتربلوتری استیک اسید (Ni-NTA) ساخت شرکت کیاژن و روش واسرشتی ارائه شده از همین شرکت ادامه یافت. پایه تمام بافرها شامل اوره ۸ مولار، تریس کلراید ۱۰ میلی مولار و سدیم دی هیدروژن فسفات ۵۰ میلی مولار و با pH برای بافرهای E, D, C, B به ترتیب ۸، ۶/۳، ۵/۹ و ۴/۵ استفاده گردید. جهت تبدیل پروتئین های نامحلول از شکل انکلوژن بادی به پروتئین محلول، ابتدا رسوب انکلوژن بادی تخلیص شده با بافر B حاوی اوره ۸ مولار تیمار شده و پس از سانتریفیوژ، مایع رویی حاوی پروتئین های محلول شده جدا گردید. پس از عبور نمونه فوق از ستون، محصولات خروجی آن جمع آوری و سنجش غلظت پروتئین این نمونه ها به روش برادفورد و بررسی آنها بر روی ژل SDS-PAGE (۱۲٪) انجام گردید (۳۳، ۳۴).

تایید پروتئین بیانی با استفاده از روش ایمنوبلات بوسیله آنتی بادی پلی کلونال ضد His Tag برای نمونه کرومات سلول بیانی حاوی پروتئین StxA موتانت انجام گردید. این فرآیند با استفاده از وسترن بلاتینگ (Western Blotting, Biorad, USA) و بافر انتقال حاوی گلایسین ۳۹ میلی مولار، تریس ۴۸ میلی مولار، متانول ۲۰ درصد و SDS ۳۷ درصد و پس از انتقال بر روی غشاء PVDF (Microporous polyvinylidene difluoride membrane) انجام گردید. غشاء PVDF در بافر PBST (Phosphat Buffer Saline Tween-20) حاوی ۵ درصد شیر خشک به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه تیمار شده و سپس سه بار با بافر PBST شستشو داده شد. پس از آن در بافر PBST حاوی آنتی بادی Anti His Tag (فرمتاز) با رقت ۱:۸۰۰۰ و سپس با آنتی بادی کانژوگه موشی (کیاژن) مجاورت داده شد. برای آشکار سازی از مخلوط ۵۰۰ میکرولیتر



تصویر شماره ۲: تکثیر ژن *stxA* موتانت بوسیله PCR با استفاده از پلاسمید *stxA/pET28a* استخراج شده از ۴ باکتری تراریختی (بیان منفی) چاهک ۱: نتیجه PCR برای نمونه کنترل منفی بدون Template چاهک ۲: نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM0321 چاهک ۳ تا ۶: قطعه تکثیر یافته *stxA* موتانت با وزن 882bp در ۴ نمونه از نمونه های تراز یخت شده

القاء کننده، منفی شد و این در حالی بود که نتایج واکنش PCR با استفاده از پلاسمید تخلیص شده تعدادی از همین نمونه ها مثبت گردید (تصویر شماره ۲).

سپس یکی از نمونه های بیانی منفی فوق، بر روی محیط جامد LB (kanamycin 80µg/ml) مجدداً کشت خطی داده شد. پس از ۱۸ ساعت گرماگذاری، تعداد ۴ کلنی تک حاصل از آن در محیط LB مایع کشت و رشد داده شد. سپس بررسی بیان و بدنبال آن انجام بهینه سازی، برای تمام نمونه های اخیر مثبت گردید (تصویر شماره ۳).

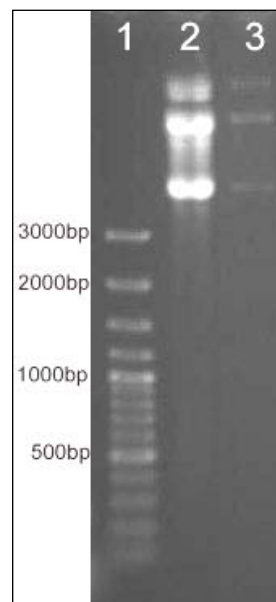
از ستون کروماتوگرافی تمایلی حاوی نیکل و با استفاده از شیب غلظت ایمیدازول در بافرهای مختلف آن، جهت تخلیص پروتئین بیانی *stxA* موتانت به شکل محلول استفاده گردید. نتیجه بررسی این محصولات بر روی ژل SDS-PAGE و پروتئین سنجی به روش برادفورد، نشان از عدم تولید پروتئین در شکل محلول داشت. تخلیص انکلوژن بادی های حاوی پروتئین بیانی، باعث حذف نسبی بسیاری از دیگر پروتئین های سلولی گردید (تصویر شماره ۴).

محلول MB Blue (Roche: Cat. No. 1 442 066) به عنوان سوپسترا و ۵۰۰ میکرولیتر آب دو بار تقطیر استفاده گردید. پس از توقف واکنش با آب مقطر، غشاء PVDF چند بار شستشو و خشک گردید (۳۵،۳۴).

یافته ها:

پس از بررسی و مطالعات دامنه دار پیرامون تعیین لوکوس های مناسب جهش، در ژن زیر واحد A، و تهیه ژن صناعی *stxA* (واجد جهش نقطه ای در سه لوکوس R170L, A231D, G234E) در وکتور بیانی pET 28a، نتایج اولیه بررسی آن بر روی ژل ۱ درصد آگاروز صحت آن را نشان داد (تصویر شماره ۱).

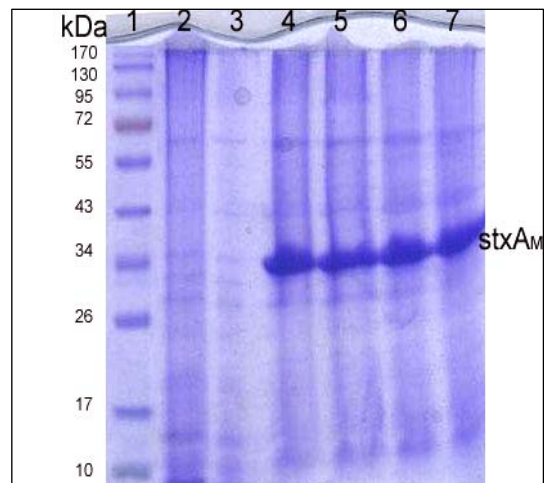
نتایج اولیه بیان و بهینه سازی ژن صناعی *stxA* موتانت، برای تمام نمونه های حاصل از تراریختی و علیرغم تکرار، در اندازه سه کمیت زمان، دما و میزان ماده



تصویر شماره ۱: کنترل و مقایسه صحت پلاسمید صناعی اصلی با پلاسمید تخلیص شده pET28a حامل ژن *stxA* جهش یافته

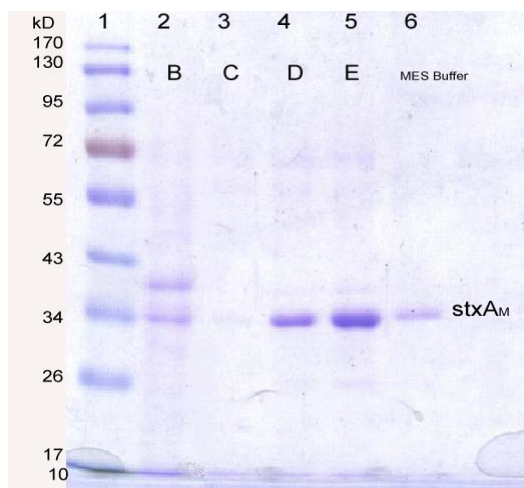
چاهک ۱- نشانگر وزنی نوکلئوتیدی #SM0321
چاهک ۲- پلاسمید اصلی تهیه شده از شرکت چینی
چاهک ۳- پلاسمید استخراج شده از نمونه تراریختی

درصد بالایی از پروتئین نامحلول موجود در انکلوژن بادی های جدا شده از سلول، با استفاده از بافر B حاوی اوره ۸ مولار به حالت محلول تبدیل می گردد. با عبور مایع رویی جدا شده ی آن از ستون نیکل به روش واسرشتی، محصولات خروجی ستون جمع آوری گردید. نتایج غلظت سنجی پروتئین به روش برادفورد و بررسی آنها بر روی ژل SDS-PAGE نشان دهنده تخلیص نسبی این پروتئین می باشد (تصویر شماره ۵).

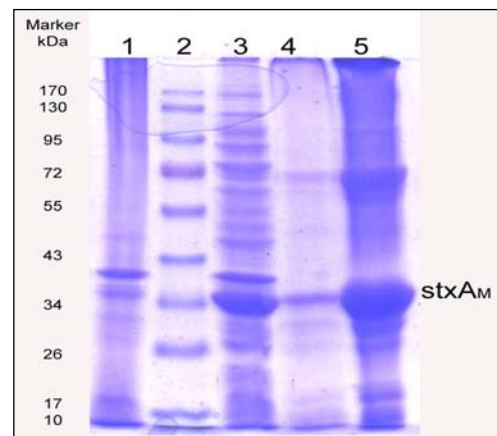


تصویر شماره ۳: نتایج SDS-PAGE برای پروتئین بیانی *stxA/pET28a* موتانت در نمونه های تراریخت مثبت

چاهک ۱: نشانگر وزنی پروتئینی #SM0671
چاهک ۲: بعنوان کنترل منفی بیان تکرار نمونه چاهک ۳ بدون اضافه کردن ماده القاء کننده IPTG
چاهک ۳: مخلوط مایع رویی هر چهار نمونه حاوی پروتئین های محلول (بعد از سونیکاسیون و سانتریفیوژ سوسپانسیون باکتری بیانی)
چاهک ۴ تا ۷: بیان پروتئین *stxA* موتانت در ۴ کلنی حاوی پلاسمید حامل این ژن (رسوب بعد از سونیکاسیون و سانتریفیوژ)



تصویر شماره ۵: بررسی پروتئین *stxA* تخلیص شده با ستون کروماتوگرافی نیکل به روش واسرشتی و با استفاده از شیب pH بر روی SDS-PAGE
چاهک ۱: نشانگر وزنی پروتئینی #SM0671
چاهک ۲: خروجی از ستون (flow) - بافر واجد اوره ۸ مولار با pH=8
چاهک ۳: خروجی از ستون (Wash) - بافر واجد اوره ۸ مولار با pH=6.3
چاهک ۴: خروجی از ستون (D) - بافر واجد اوره ۸ مولار با pH=5.9
چاهک ۵: خروجی از ستون (E) بافر واجد اوره ۸ مولار با pH=4.5
چاهک ۶: خروجی بافر MES از ستون



تصویر شماره ۴: نتایج ژل الکتروفورز جهت مشخص شدن نوع پروتئین بیانی *stxA/pET28a* از نظر محلول یا نامحلول بودن

چاهک ۱: کنترل منفی (کرود سلول باکتری بدون ماده القاء کننده IPTG)
چاهک ۲: نشانگر وزنی پروتئینی #SM0671
چاهک ۳: کرود سلول بیانی (بعد از سونیکاسیون واجد باند پروتئین بیانی *stxAm*) با وزن حدود ۳۶ کیلو دالتون
چاهک ۴: مایع رویی جدا شده بعد از سونیکاسیون و سانتریفیوژ نمونه چاهک ۳ (حاوی پروتئین های محلول سلولی)
چاهک ۵: رسوب جدا شده بعد از سونیکاسیون و سانتریفیوژ نمونه چاهک ۳ (حاوی انکلوژن بادی نیمه تخلیص شده)

همچنین نتایج وسترن بلات (Western Blotting) با استفاده از آنتی بادی Anti-His Tag تایید کننده صحت پروتئین بیانی *stxA* موتانت واجد دنباله 6His با وزن حدود ۳۶ کیلو دالتون می باشد (تصویر شماره ۶).

تجربی علمی، با پاساژ مجدد یکی از این نمونه ها بر روی محیط جامد، بیان برای تمام کلنی های تک حاصل از پلیت اخیر مثبت گردید. که علیرغم بررسی های فراوان علت این امر نامشخص، ولی عملاً اثبات گردید.

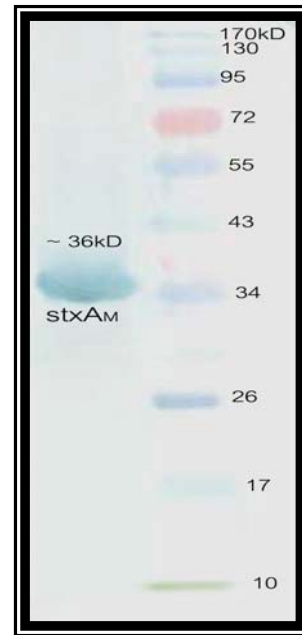
علیرغم تغییر کمیت های سه گانه زمان و دما و میزان ماده القاء کننده، پروتئین بیانی StxA موتانت تماماً بصورت انکلوژن بادی بود. در نتیجه تخلیص آن بوسیله ستون نیکل و منحصراً با روش واسرشتی امکان پذیر می باشد. در عین حال نویسنده و همکاران در حال ادامه روند بهینه سازی تخلیص و سپس بررسی های ایمنی زایی پروتئین حاصل در حیوان می باشند. خوشبختانه تاکنون نتایج نسبتاً خوبی نیز حاصل شده که پس از تکمیل، نتایج آن در گزارش بعدی ارائه خواهد شد.

همچنین مشاهده باند اختصاصی مربوط به پروتئین بیانی StxA موتانت در وسترن بلات تایید کننده صحت این پروتئین می باشد. مشاهده پروتئین بیانی StxA موتانت با وزن ۳۲ کیلودالتون در تصاویر ژل SDS-PAGE و وسترن بلات در جایگاه ۳۶ کیلو دالتون به قطعه حدود ۴ کیلو دالتون اضافه شده از سازه pET28a مربوط می باشد.

در این مطالعه آزمایشات فراوانی با استفاده از روش های متعدد، جهت بیان و بهینه سازی و تخلیص StxA موتانت انجام گردید. اگرچه بررسی دیگر روش های تخلیص همچنان در حال اجراست و تداوم دارد، ولی به نظر می رسد انجام پیشنهاد زیر همسانه سازی ژن StxA موتانت از pET28a به pET32a راه حصول به پروتئین بیانی در شکل محلول را فراهم آورد.

تشکر و قدردانی:

با تشکر از پروفیسور Panda. K. A از دانشگاه دهلی کشور هند، دکتر میر لطیف موسوی از دانشگاه شاهد، دکتر علی هاتف سلمانیان از پژوهشگاه ملی ژنتیک بخاطر مشاوره های موثرشان و همچنین تقدیر از حمایت های سازمان بسیج علمی کشور.



تصویر شماره ۶: وسترن بلات پروتئین تخلیص شده بیانی StxA جهش یافته

بحث:

تاکنون گزارشات فراوانی پیرامون تولید پروتئین نو ترکیب با کاندید واکسن علیه شینگاتوکسین ارائه شده است. در آخرین گزارشات موجود، از پروتئین نو ترکیب واجد جهش در نقاط A231D- G234E (مسیر دوم با کاهش ۳۰۰ برابری سمیت) و در یک مورد گزارش دیگر، از پروتئین زیر واحد A واجد جهش در جایگاه فعال R170L (مسیر سوم با کاهش ۲۰۰ برابری سمیت) و معرفی آنها به عنوان کاندیدهای مناسب علیه شینگاتوکسین ذکر شده است (۳۱،۳۰). در این مطالعه برای اولین بار طراحی این ژن با هر سه جهش فوق بصورت همزمان صورت گرفت که به نظر می رسد با استفاده از این آرایش جدید جهش، کاهش تصاعدی اثر سمیت پروتئین بیانی حاصل، توقع دور از انتظاری نباشد. البته بدیهی است که بررسی ایمنی زایی آن روشن کننده این فرضیه خواهد بود.

آنچنان که در نتایج مشاهده گردید بررسی های مکرر بیان نمونه های حاصل از تراریختی مرحله اول برای StxA موتانت منفی گردید ولی بنا به یک توصیه

منابع:

1. Clemens J, Kotloff K, Kay B. Generic protocol to estimate the burden of shigella diarrhea and dysenteric mortality. Geneva: WHO Text Book; 1999.
2. World Gastroenterology Organisation practice guideline: Acute diarrhea. USA. 2008.
3. Shantini DG. Shiga toxin-encoding phage from *Escherichia coli* O₁₅₇:H7 interactions with non-pathogenic *E. coli* and implications for toxin production [dissertation] Ohio: Univ Cincinnati. 2004.
4. Ghosh RN, Mallet WG, McGraw T, Maxfield FR. An endocytosed TGN38 chimeric protein is delivered to the TGN after trafficking through the endocytic recycling compartment in CHO cells. *J Cell Biol.* 1998 Aug; 142(4): 923-36.
5. Goguen J. *Listeria Shigella E. coli*, *Salmonella*. *J Immunol.* 2003; 5: 220-8.
6. Hurley BP, Thorpe CM, Acheson D. Shiga toxin translocation across intestinal epithelial cells is enhanced by neutrophil transmigration. *Infect Immun.* 2001; 69(10): 6148-55.
7. Suhan ML, Hovde J. Disruption of an internal membran- spanning region in shiga toxin 1 reduces cytotoxicity. *Infect Immun.* 1998; 66(11): 5252-59.
8. Sandvig K, Deurs B. Transport of protein toxins into cells: pathways used by ricin, cholera toxin and shiga toxin. *FEBS Lett.* 2002 Oct; 529(1): 49-53.
9. Obrig JT. Shiga toxin mode of action *E. coli* O₁₅₇: disease. *Front Biosci.* 1997 Dec; 2:d635-42.
10. Kay SA, Louise CB, Boyd B, Lingwood CA, Obrig T. Shiga toxin-associated hemolytic syndrome: interleukin-1 beta enhancement of Shiga toxin cytotoxicity toward human vascular endothelial cells in vitro. *Infect Immun.* 1993 Sep; 61(9): 3886-91.
11. Jung-Keun S, Carolyn J. Shiga toxin attacks bacterial ribosomes as effectively as eukaryotic ribosome. *Biochemistry.* 1998 Jun; 37(26): 9394-8.
12. Brown JE, Rothman SW, Doctor BP. Inhibition of protein synthesis in intact hela cells by shigella dysenteriae 1 toxin. *Infect Immun.* 1980; 29(1): 98-107.
13. Alto NM, Shao F, Lazar CS, Brost RL, Chua G, Mattoo S, et al. Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell.* 2006; 124(1): 133-45.
14. Sandvig K. Shiga toxins. *Toxicon.* 2001; 39(11): 1629-35.
15. Blanco J, Blanco M, Mora A. Production of toxins (Enterotoxin, Verotoxin and Neurotoxins) and colicins by *E. coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov; 35(11): 2953-7.
16. Gerald T, Jacewicz M. The pathogenesis of shigella diarrhea V, relationship of shigella enterotoxin, neurotoxin, and cytotoxin. *J Infect Dis.* 1975 May; 13(Suppl): 33-9.
17. Lafont F, Nhieu GT, Hanada K, Sansonetti P. Initial steps of shigella infection depend on the cholesterol sphingolipid raft- mediated CD44 – IpaB interaction. *EMBO J.* 2002 Sep; 21(17): 4449-57.
18. Brown J, Griffin E, Rothman W. Purification and biological characterization of shiga toxin from shigella dysenteriae 1. *Infect Immun.* 1982; 36(3): 996-1005.
19. Min Y, David BH. Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect Immun.* 2005; 73(4): 2524-32.
20. Cherla RP, Sang-Yun L, Tesh V. Shiga toxins and apoptosis *FEMS Microbiol Lett.* 2003 Nov; 228(2): 159-66.
21. Mari O, Masafumi Y, Chikako TM, Yoshikazu Y, Yoshifumi T, Hiroshi K. Nontoxic shiga toxin derivatives from *Escherichia coli* possesses adjuvant activity for the Augmentation of antigen-specific immune responses via dendritic cell activation. *Infect Immun.* 2005; 73(7): 4088-97.

22. Levine MM, Sztein MB. Vaccine development strategies for improving immunization: the role of modern immunology. *Nat Immunol*. 2004; 5: 460-4.
23. Olivier A, Benoit V, Ludovic F, Protul S, Yu-Chun L, Ludger J, et al. Subunit of shiga toxin-based vaccines synergize with-galactosylceramide to break tolerance against self antigen and elicit antiviral immunity. *J Immunol*. 2007 Sep; 179(5): 3371-9.
24. Benoit V, Olivier A, Delphine P, Steffen J, Protul S. The shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur J Immunol*. 2006 May; 36(5): 1124-35.
25. Paola M, Thomas P, Griener GL, Mulvey Glen DA. Recombinant shiga toxin B subunit-keyhole limpet hemocyanin conjugate vaccine protects mice from Shigatoxemia. *Infect Immun*. 2005; 73(10): 6523-29.
26. Pistone V, Creydt MF, Miyakawa F, Martín E, Zotta C, Silberstein, et al. The shiga toxin2 B subunit inhibits net fluid absorption in human colon and elicits fluid accumulation in rat colon loops. *Braz J Med Biol Res*. 2004; 37(6): 799-808.
27. Mona O, Saeid B, Soheila A. Immune responses of mice immunized with active recombinant shiga toxin and its derivatives. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2008; 7(2): 53-60.
28. Sharon X, Wen LD, Teel NA, Judge Alison D, Brien O. A plant-based oral vaccine to protect against systemic intoxication by Shiga toxin type 2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103(18): 7082-87.
29. Basu I, Ferens WA, Stone DM, Hovde CJ. Antiviral activity of shiga toxin requires enzymatic activity and is associated with increased permeability of the target cells. *Infect Immun*. 2003; 71(1): 327-34.
30. Satoshi I, Kazuyoshi K, Yutaka K, Yasunori I, Aki K, Danbara H, et al. Protection against shiga toxin1 challenge by immunization of mice with purified mutant shiga toxin1. *Infect Immun*. 2003; 71(6): 3235-39.
31. Panda AK, Singh SM. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng*. 2005 Apr; 99(4): 303-10.
32. Thatcher DR, Hitchcock A. Protein folding in biotechnology. In: Pain RH. Mechanisms of protein Folding. *Frontiers in molecular biology*. UK: Oxford: Series IRL Press; 1994; p: 229-61.
33. Wingfield PT, Palmer I, Liang SM. Folding and purification of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci*. 2001 May; 6: 605.
34. Crowther JR. Eliza theory and practice. USA: Totowa NJ. Country of Pub; 1995.
35. Bollage DM, Michel DR, Edeststein SJ. Protein method. NewYork: Wiley-Liss; 1996.

***Shigella dysentery* stxA mutant (R170L-A231D-G234E) gene design and optimization of recombinant protein expression and purification**

Olad GhR (PhD student)*¹, Tavalae M (PhD)², Mohammad-Hassan Z (PhD)³, Ebrahimi F (PhD)¹, Salimian J (PhD)¹, Nazarean Sh (PhD student)¹, Rahimi AA (PhD)¹

¹Biological Research Center, Imam Hosain University, Tehran, Iran, ²Applied Biotechnological Research Center, Baghiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran, ³Medical Sciences faculty, Tarbiat Modaress University, Tehran, Iran

Received: 14/Apr/2011 Revised: 5/Jan/2011 Accepted: 15/July/2011

Background and aims: *Shigella dysentery* is one of the most important human pathogenic intestinal bacteria. Entrance of the shigella toxin into the epithelial cells inhibits protein synthesis leading to cell death. In spite of great investigations on vaccine production against *S. dysentery*, studying to achieve significant stxA recombinant protein still remains important.

The objective of this study was to determine the appropriate mutation loci and designing stxA subunit synthetic gene, its further expression and optimization and ultimately assaying purification method for further immunization studies.

Methods: Three mutant stxA gene including (R170L-A231D-G234E) were designed and the synthetic gene in pET28a plasmid was obtained and confirmed by PCR. Thereafter the plasmid was transformed into the host cell *E.coli* BL21 DE3 after which gene expression was optimized and protein purity assay was then performed.

Results: Preliminary studies led to mutant stop gene design, after which it was confirmed by synthetic plasmid and PCR. Expression and optimization were then performed which resulted in large amount of protein inclusion bodies. Purification of inclusion bodies and protein which resulted solubilization was done with a combinatorial method.

Conclusion: With regard to the mechanism of shiga toxin effect and favorable mutation design with new arrangement, less toxicity of expressing protein is predicted than previous other mutants, posing a better vaccine candidate.

Keywords: Expression optimization, Mutant stxA, Recombinant vaccine, Shiga toxin, *Shigella dysentery*.

Cite this article as: Olad GhR, Tavalae M, Mohammad-Hassan Z, Ebrahimi F, Salimian J, Nazarean Sh, Rahimi AA. [*Shigella dysentery* stxA mutant (R170L-A231D-G234E) gene design and optimization of recombinant protein expression and purification. J Sharekord Univ Med Sci. 2011 Dec, Jan; 13(5): 93-102.]Persian

*Corresponding author:

Biological Research Center, Imam Hossain University, Tehran, Iran, Tel: 0098-09128043492,
E-mail: grolad@gmail.com